

Technique immunoenzymatique appliquée au diagnostic sérologique de la péripneumonie.

Note préliminaire

C. Le Goff¹

Une nouvelle méthode de dosage des anticorps péripneumoniques est présentée : le test immunoenzymatique qui utilise des microplaques sensibilisées par un ultrasonnat de *Mycoplasma mycoides*. Il est possible de définir un seuil de positivité par concordance avec la méthode classique de fixation du complément. **Mots clés :** Péripneumonie contagieuse bovine - *Mycoplasma mycoides* - Test immunoenzymatique - Fixation du complément.

et de France. Nous avons étudié 233 sérums qui, préalablement examinés en F.C', se répartissent en 22 positifs (fixation complète 4 + à la dilution du 1/10) et 211 négatifs (hémolyse totale à la dilution du 1/10) ; ces derniers ont été traités en grand nombre, afin de préciser le seuil d'interprétation de la méthode. Il est à noter que les sérums positifs sont issus d'animaux cliniquement malades ; ne possédant encore qu'un nombre très limité de sérums d'animaux vaccinés, cette étude fera l'objet d'un développement ultérieur.

INTRODUCTION

Le diagnostic sérologique de la péripneumonie contagieuse des bovins est toujours effectué grâce à la méthode de fixation du complément (F.C') décrite par CAMPBELL et TURNER (2). Nous nous proposons, dans ce travail, d'appliquer un test immunoenzymatique (TIE) pour le dépistage de cette maladie (5).

Cette méthode, d'introduction récente pour les études épidémiologiques, présente l'avantage de pouvoir être réalisée à grande échelle et d'être très sensible (1, 3, 4, 6). Cependant, nous nous sommes attachés plus particulièrement à définir les modalités d'exécution et la spécificité du test. L'optique de ce travail est de se placer dans les conditions d'un dépistage systématique où l'on obtient des réponses significativement supérieures ou inférieures à un seuil de positivité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sérums

Les sérums proviennent en majorité d'Afrique, de Nouvelle-Calédonie, mais aussi de Tahiti, du Portugal

Antigène

Une souche de mycoplasme (*Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*) est mise en culture pendant 8 jours dans du milieu Difco P.P.L.O. contenant 15 p. 100 de sérum de cheval et 10 p. 100 d'extrait de levure. Le culot de culture, lavé deux fois en tampon phosphate (PBS-pH 7,4) puis ajusté à l'opacité correspondant au tube 40 de Brown, est ensuite soumis à l'action des ultrasons, pendant 20 min (M.S.E. Mullard 20 K.cycles/s). Une autre centrifugation (40 000 g-30 min) permet la récupération des membranes.

Le culot est traité au lauryl-sulfate de sodium à 0,2 p. 100 (V/V). Après dialyse, différentes dilutions de l'antigène sont testées en TIE, afin de déterminer le titre de la solution de travail. La dilution d'emploi retenue est généralement celle du 1/200.

Mode opératoire

La définition des différents paramètres (dilution des réactifs, temps d'incubation, etc.) a été établie lors d'expériences préliminaires, afin d'aboutir à une optimisation du système.

Sensibilisation des plaques*

Chaque cupule reçoit 100 µl d'antigène dilué dans du PBS-pH 7,4 ; la plaque est recouverte de ruban adhésif et mise à l'étude à 37 °C pendant 2 heures, lavée

1. IEMVT-CIRAD, service de pathologie infectieuse, section microbiologie, 10, rue Pierre-Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France. (Article reçu pour publication le 24 septembre 1986.)

* Flow Laboratories.

C. Le Goff

ensuite 4 fois avec une solution de NaCl 0,15 M additionnée de Tween 20 à 0,05 p. 100.

Incubation des sérums

Les sérums à examiner sont dilués du 1/100 au 1/12 800 dans du tampon PBS additionné de Tween 20 à 0,05 p. 100 et de gélatine à 0,5 p. 100. On dépose 100 µl de chacune des dilutions de sérum. Pour une lecture automatique des résultats, on réserve la première rangée de 8 puits de la microplaque au blanc réactif constitué par un volume de tampon équivalent à celui du sérum. On incube à l'étuve à 37 °C et on effectue au bout d'une heure une série de 4 lavages.

Incubation du conjugué

Le conjugué (anticorps de lapin anti-immunoglobuline bovine marqués à la peroxydase*) est dilué au 1/1 000 dans le tampon de dilution des sérums, chaque puits reçoit 100 µl de conjugué dilué. La plaque est incubée 1 heure à l'étuve à 37 °C et lavée comme précédemment.

Révélation

La solution de réaction enzymatique est préparée extemporanément par addition du substrat, l'orthophénylène diamine (40 mg) à 100 ml de tampon citrate pH 5 additionné de 1,5 ml d'eau oxygénée à 10 volumes. Chaque cupule reçoit 100 µl de la solution.

La coloration se développe à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière. Après 30 min d'incubation, la D.O. est enregistrée à 492 nm, grâce à un spectrophotomètre lecteur de plaques**.

* Nordic M.D.

** Titertek Multiskan M.D.

RÉSULTATS

Les résultats acquis sont consignés dans le tableau I.

Si, pour la majorité des sérums positifs et négatifs, l'écart des D.O. (densités optiques) enregistré est satisfaisant et permet de les classer facilement, il apparaît que pour certains d'entre eux les valeurs se confondent, déterminant ainsi une zone où toute interprétation est délicate.

La dilution au 1/100 du sérum est celle où le chevauchement est moindre ; elle donne donc la meilleure résolution du test. Nous définissons également à cette dilution un seuil de positivité égal à 0,4 de D.O. ; il s'agit de la plus basse valeur notée dans l'échantillonnage des sérums positifs. Toutefois, 11,4 p. 100 des sérums positifs en TIE sont négatifs en F.C'.

Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, nous avons rapproché toutes les mesures des D.O. obtenues avec un sérum positif de contrôle testé lors de plusieurs essais. Aux fortes concentrations d'anticorps, la variation maximale de D.O. est de $\pm 0,10$, ce qui est satisfaisant compte tenu de l'extrême sensibilité de la méthode. Cependant, pour avoir ces valeurs, le protocole doit être suivi avec rigueur, car la moindre modification des paramètres peut apporter des changements spectaculaires dans les résultats.

DISCUSSION

L'avantage du TIE sur la F.C' réside surtout dans la possibilité de détecter l'ensemble des anticorps péripneumoniques, alors que dans la F.C', il s'agit surtout des anticorps anti-galactane.

Ce test, tel que décrit dans cette note, est réalisé à l'aide d'un antigène brut non purifié, ce qui explique qu'il y ait chevauchement entre les sérums négatifs ayant un fort bruit de fond et certains sérums positifs.

TABLEAU I Densités optiques (DO) enregistrées à la dilution 1/100 des sérums.

	DO	0-0,099	0,1-0,199	0,2-0,299	0,3-0,399	0,4-0,499	0,5-0,599	0,6-0,699	0,7-0,799	0,8-0,899	0,9-0,999	1-1,099
Sérums négatifs	n	5	42	91	49	17	5	2				
	p. 100	2,4	19,9	43,1	23,2	8,1	2,4	0,9				
Sérums positifs	n					1	0	1	4	7	7	2
	p. 100					4,6	0	4,6	18,2	31,8	31,8	9

La sensibilité du test ELISA est contrebalancée par une spécificité diminuée.

Des perfectionnements seront prochainement apportés pour l'amélioration de l'antigène. La préparation d'un antigène spécifique d'origine membranaire est en cours, ce qui éliminera, nous l'espérons, les fausses réactions positives.

CONCLUSION

Les résultats rapportés dans ce travail permettent de montrer l'intérêt présenté par le test immunoenzymati-

que, notamment par sa sensibilité. D'ores et déjà, ce TIE peut être employé tel qu'il est décrit pour le dépistage rapide sur un grand nombre de sérums, les positifs limités en TIE devant être repris en F.C., afin d'éliminer les sérums faussement positifs.

Cette procédure en deux temps peut être intéressante lors de dépistage dans des régions peu infectées ou dans des pays où les conditions de travail rendent la réaction de fixation du complément fastidieuse et aléatoire. Néanmoins, si l'utilisation en routine de ce test peut se réaliser à l'échelon du laboratoire, on ne pourra pas envisager son extension avant d'avoir standardisé les réactifs, défini un sérum positif et négatif de contrôle et uniformisé matériel et méthodes. ■

LE GOFF (C.). Immunoenzymatic technique (ELISA) applied to the serological diagnostic of contagious bovine pleuropneumonia. Preliminary note. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1986, **39** (2) : 171-173.

A new method is described for detecting pleuropneumonia antibodies : the enzyme immunoassay (EIA) which is performed on microplates sensitized with an antigen extract from *M. mycoides*. By correlation with the classical complement fixation test (CFT), a positive level can be defined. *Key words* : Pleuropneumonia - *Mycoplasma mycoides* - Enzyme immunoassay - Complement fixation test.

LE GOFF (C.). Técnica inmunoenzimática aplicada al diagnóstico serológico de la perineumonía contagiosa bovina. Nota preliminar. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1986, **39** (2) : 171-173. Se presenta un nuevo método de título de los anticuerpos perineumónicos : la prueba inmunoenzimática que utiliza microláminas sensibilizadas por un extracto de antígeno de *Mycoplasma mycoides*. Se puede determinar un nivel de positividad por correlación con el método clásico de fijación del complemento. *Palabras claves* : Perineumonía - *Mycoplasma mycoides* - Prueba ELISA - Fijación del complemento.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOOTHBY (J. T.), JASPER (D. E.), LUTZ (H.), ROLLINS (M. H.). Gel electrophoresis-derived enzyme-linked immunosorbent assay of serum from cows resistant to and cows susceptible to challenge exposure with *Mycoplasma bovis*. *Am. J. vet. Res.*, 1982, **43** (3) : 553-556.
2. CAMPBELL (A. D.), TURNER (A. W.). Studies on contagious pleuropneumonia of cattle. IV. An improved complement-fixation test. *Aust. vet. J.*, 1953, **29** : 154-163.
3. HOROWITZ (S. A.), CASSELL (G. H.). Detection of antibodies to *Mycoplasma pulmonis* by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.*, 1978, **22** (1) : 161-170.
4. LEBEL (E.), DAVIDSON (I.), MALKINSON (M.), BAR-MOSHE (B.), RAPOPORT (E.). Vaccination trials against caprine *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* large colony infection in young goats. II. Detection of antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Refuah vet.*, 1982, **39** (3) : 85-90.
5. ONOVIRAN (O.), TAYLOR-ROBINSON (D.). Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* in cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Rec.*, 1979, **25** : 165-167.
6. PIROIRD (R.), LOMBARD (M.). Les méthodes immunoenzymatiques et leurs applications sérologiques. *Revue Méd. vét.*, 1980, **131** (1) : 25-42.